

IN VITRO- UND IN VIVO UNTERSUCHUNGEN FÜR EINE
NICHT-VIRALE UND THERAPIE-REGULIERBARE
TUMORGENTHERAPIE

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Biochemie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. rer. nat. Wolfgang Walther

geboren am 02. Oktober 1957 in Frankfurt (Oder)

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: Februar 2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. Brigitte Royer-Pokora

2. Prof. Dr. Klaus Cichutek

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 19. Februar 2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1. Grundlagen der Tumorgentherapie	6
1.2. Vektoren und regulierbare Genexpression in der Tumorgentherapie	8
1.3. Strategien zum nicht-viralen Gentransfer	9
1.4. Gentherapie im Kontext konventioneller Tumorthherapie	11
2. FRAGESTELLUNG	13
LITERATUR	15
3. DIE JET-INJECTION TECHNOLOGIE FÜR DEN NICHT-VIRALEN IN VIVO GENTRANSFER IN TUMOREN	19
3.1.	19
In vivo gene transfer by low-volume jet injection. Cartier R, Ren SV, <u>Walther W</u> , Stein U, Lewis A, Schlag PM, Li M, Furth PA. <i>Anal. Biochem</i> 282: 262-265, 2000.	
3.2.	19
Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology. <u>Walther W</u> , Stein U, Fichtner I, Malcherek L, Lemm M, Schlag PM. <i>Gene Ther.</i> 8: 173-180, 2001.	
3.3.	19
Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer. <u>Walther W</u> , Stein U, Fichtner I, Voss C, Schmidt T, Schleef M, Nellessen T, Schlag PM. <i>Mol. Biotechnol.</i> 21: 105-115, 2002.	
3.4.	19
Stability analysis for long term storage of naked DNA: impact on non-viral in vivo gene transfer. <u>Walther W</u> , Stein U, Voss C, Schmidt T, Schleef M, Schlag PM. <i>in Revision</i> , 2003.	

4. UNTERSUCHUNGEN ZUM RETROVIRALEN UND LIPOSOMALEN GENTRANSFER VON TUMORZELLEN_____	20
4.1. _____	20
Lipoplexes with alkylphospholipid as new helper lipid for efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy. Zeisig R, Ress A, Fichtner I, <u>Walther W</u> . <i>Cancer Gene Ther.: im Druck, 2003.</i>	
4.2. _____	20
Influence of retrovirally transduced human tumor necrosis factor α on the Expression of c-myc, K-ras, c-jun, p53, TGF α and CEA in human colon carcinoma cell lines. Uckert W, <u>Walther W</u> , Hummel O. <i>Int. J. Oncol. 6: 1027-1031, 1995.</i>	
5. CHARAKTERISIERUNG UND NUTZUNG THERAPIE-INDUZIERBARER PROMOTOREN FÜR EINE KONDITIONELLE TUMORGENTHERAPIE__	
5.1. _____	21
Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting. <u>Walther W</u> , Stein U. <i>J. Mol. Med. 74: 379-392, 1996.</i>	
5.2. _____	21
Vincristine induction of mutant and wild-type human multidrug-resistance promoters is cell-type-specific and dose-dependent. Stein U, <u>Walther W</u> , Shoemaker RH. <i>J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 275-282, 1996.</i>	
5.3. _____	21
Employment of the mdr1 promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer gene therapy. <u>Walther W</u> , Wendt J, Stein U. <i>Gene Ther. 4: 544-552, 1997.</i>	
5.4. _____	21
mdr1 promoter-driven tumor necrosis factor- α expression for a chemotherapy- controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors. <u>Walther W</u> , Stein U, Fichtner I, Alexander M, Shoemaker RH, Schlag PM. <i>Cancer Gene Ther. 7: 893-900, 2000.</i>	
5.5. _____	21
Use of the human mdr1 promoter for heat-inducible expression of therapeutic genes. <u>Walther W</u> , Stein U, Schlag PM. <i>Int. J. Cancer 98: 291-296, 2002.</i>	

5.6.	21
Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter.	
Lange C, <u>Walther W</u> , Schwabe H, Stein U.	
Biochem. Biophys. Res. Comm. 278: 125-133, 2000.	
 6. CHEMOSENSITIVIERUNG ALS STRATEGIE FÜR DIE GENTHERAPIE VON TUMOREN	 22
6.1.	22
Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance.	
Stein U, <u>Walther W</u> , Shoemaker RH.	
<i>Br. J. Cancer</i> 74: 1384- 1391, 1996.	
6.2.	22
Reversal of multidrug resistance by transduction of cytokine genes into human colon carcinoma cells.	
Stein U, <u>Walther W</u> , Shoemaker RH.	
<i>J. Natl. Cancer Inst.</i> 88: 1383-1392, 1996.	
6.3.	22
Tumor necrosis factor- α and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP.	
Stein U, <u>Walther W</u> , Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH.	
<i>J. Natl. Cancer Inst.</i> 89: 807-813, 1997.	
6.4.	22
Gene transfer of human TNF α into glioblastoma cells permits modulation of mdr1 expression and potentiation of chemosensitivity.	
<u>Walther W</u> , Stein U, Pfeil D.	
<i>Int. J. Cancer</i> 61: 832-839, 1995.	
 7. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	 23
7.1. Die Jet-Injection Technologie für den nicht-viralen in vivo Gentransfer in Tumoren	23
7.2. Untersuchungen zum retroviralen und liposomalen Gentransfer in Tumorzellen	24
7.3. Charakterisierung und Nutzung Therapie-induzierbarer Promotoren für eine konditionelle Tumorgentherapie	26
7.4. Chemosensitivierung als Strategie für die Gentherapie von Tumoren	29

8. ZUSAMMENFASSUNG UND WERTUNG	32
DANKSAGUNG	35
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	36

1. EINLEITUNG

1.1. Grundlagen der Tumorgentherapie

Die Erkenntnisse zu den molekularen Mechanismen der Tumorentstehung, die Identifizierung von Genen, die ursächlich in das Geschehen der malignen Transformation und des malignen Wachstums involviert sind, machen es erstmals möglich, Angriffspunkte für eine Tumorthherapie auf molekularer Ebene zu finden und zu nutzen. Da Tumorerkrankungen eine hohe Inzidenz besitzen, sind sie für die Gentherapie von besonderem Interesse. Die Zahl von 376 Tumorgentherapie-Protokollen, die mehr als 60% aller Gentherapie-Protokolle ausmachen und in denen mehr als 2300 Patienten involviert sind (Stand September 2001), spiegelt die großen Aktivitäten auf dem Gebiet wieder.

Die Gentherapie stellt eine Therapieform dar, die Nukleinsäuren wie DNA oder RNA als pharmakologische Agenzien nutzt. Dabei sind die therapeutischen Strategien entweder auf das Einbringen von Genkonstrukten gerichtet, die für therapeutisch wirksame Proteine/Enzyme kodieren oder die gezielt in die genetische Regulation jener Prozesse eingreifen, die für die z.B. Tumorgenese und Progression verantwortlich sind. Obwohl die Intention der Gentherapie im ursprünglichsten Sinne des Wortes primär die Therapie defekter Gene vor allem bei genetisch bedingten Erbkrankheiten (z.B. Mukoviszidose, Hämophilie) zum Ziel hatte, ist die große Potenz dieser Therapieform für die Behandlung von Tumorerkrankungen schnell erkannt worden (**Anderson 1992**). Hierbei steht besonders die somatische Gentherapie im Vordergrund, bei der therapeutisch aktive Genkonstrukte in Tumorzellen transduziert werden. In der Tumorgentherapie werden hauptsächlich drei Wege beschritten: 1. die Gensubstitution; 2. die additive Geninsertion und 3. die Gensuppression und/oder Antisense-Gentherapie.

Bei der Gensubstitution wird durch das Einbringen der funktionalen Wildtyp-Genkopie der in den Tumorzellen manifeste Gendefekt behoben. In vitro konnte gezeigt werden, dass durch diese Strategie der maligne Phänotyp beeinflussbar ist (**Bishop 1991, Roth et al. 1999**). Problematisch jedoch ist hierbei die Notwendigkeit, möglichst alle Tumorzellen dieser Gensubstitution zu unterziehen – eine Voraussetzung, die noch immer klinisch schwer realisierbar ist. Derzeit laufen bereits klinische Studien, die z.B. mit Hilfe lokaler Applikation retroviraler oder adenoviraler Vektoren das Wildtyp-p53 Tumorsuppressorgen z.B. in nicht-kleinzellige Lungentumoren einbringen (**Roth et al. 1996, Swisher et al. 1997**). Die bisherigen Ergebnisse zeigen zwar einen erfolgreichen Gentransfer, weisen aber nur partiell antitumorale Wirkungen auf.

Aus diesem Grunde wird noch immer die additive Geninsertion für die Tumorgentherapie favorisiert, bei der Gene in die Tumorzellen transferiert werden, die für therapeutisch wirksame Proteine kodieren. So werden zur Stimulation der antitumoralen Immunantwort Zytokingene (IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) oder Gene kostimulatorischer Moleküle (z.B. HLA-B7) transferiert. Die Immun-Gentherapie macht derzeit noch immer den größten Anteil bei den entsprechenden klinischen Studien aus, denn in ca. 28% aller Tumorgentherapie-Studien werden kostimulatorische Moleküle und in 33% der Studien Zytokingene transferiert.

Alternativ können im Rahmen der additiven Geninsertion Suizidgene in Tumorzellen gebracht werden, die zur direkten Abtötung der Zellen führen sollen. Derartige Suizidgene kodieren z. B. für virale oder bakterielle Enzyme, die selektiv in den genetisch modifizierten Tumorzellen nichttoxische Prodrugs in toxische, antitumoral aktive Metabolite umwandeln. Besonders intensiv wird die Herpes-Simplex Thymidinkinase und die Cytosindeaminase für diese Suizidgen-Strategien eingesetzt und auch in klinischen Gentherapie-Studien untersucht (**Alvarez et al. 1997, Mullen et al. 1992**). Als vorteilhaft bei der Suizidgentherapie hat sich der sogenannte Bystander-Effekt erwiesen, da durch dieses Phänomen nicht nur unmittelbar Suizidgen-transduzierte Tumorzellen, sondern auch benachbarte nicht-transduzierte Tumorzellen eliminiert werden (**Pope et al. 1997**).

Eine andere Strategie in der Tumorgentherapie verfolgt das Ziel, die fehlerhafte oder inadäquate Expression von Onkogenen in den Tumorzellen auszuschalten. Diese als Gensuppression bezeichnete Vorgehensweise versucht z.B. spezifisch die Transkription der mRNA solcher Gene zu stören oder direkt diese mRNA-Moleküle durch Degradation zu zerstören (**Gerwitz et al. 1998, Kijima et al. 1995**). Noch vor einigen Jahren war diese Strategie im experimentellen Stadium und zeigte ermutigende in vitro-Ergebnisse. Inzwischen aber hat diese Strategie auch die Ebene der klinischen Studien erreicht, da z.B. durch chemische Modifikationen der nur 13 bis 25 Basen langen Oligonukleotide deren Bioverfügbarkeit und Stabilität gegenüber Nukleasen verbessert werden konnte (**Luger 2000**). Klinische Studien, in denen Antisense-Oligonukleotide systemisch z.B. gegen das c-raf-1 Onkogen oder das BCL-2 Protoonkogen eingesetzt werden, zeigen in gewissem Umfang ein Ansprechen der Tumoren bei diesen Patienten (**O'Dwyer et al. 1999, Webb et al. 1997**). Nicht zuletzt deshalb werden für diese Strategie der Gensuppression inzwischen Phase II Studien in Angriff genommen.

1.2. Vektoren und regulierbare Genexpression in der Tumorgentherapie

Neben den verschiedenen Strategien des Gentransfers und der stets wachsenden Zahl an therapeutisch aktiven Genen werden parallel große Anstrengungen unternommen, geeignete sichere und effiziente Gentransfersysteme zu entwickeln. Noch immer werden in den meisten Studien hierzu retrovirale Vektoren genetisch modifizierter RNA-Viren (Retroviren) verwendet, nicht zuletzt wegen ihrer hohen Effizienz des Gentransfers und der langen experimentellen Erfahrungen mit diesen Systemen (**Walther *et al.* 2000**). Jedoch werden die retroviralen Vektoren auch immer mehr von den gleichfalls effizienten Adenovirus-Vektoren und Herpes Virus-Vektoren (modifizierte DNA-Viren) ergänzt. Intensive Bemühungen werden unternommen, um diese Vektoren sicherer zu gestalten. Dazu wird vor allem am Tumor-spezifischen Targeting der Virusinfektion (Design der Virushülle) und der Zelltyp-spezifischen Expression (spezifische Promotoren) der therapeutischen Gene gearbeitet (**Nettelbeck *et al.* 2000**). Nicht-virale Gentransfer-Systeme, wie z.B. Liposomen, Lipoplexe, die in vivo-Elektroporation (Elektrotransfer), Gene-Gun (Particle Bombardment) oder die in vivo-Jet-Injection gewinnen an Bedeutung und haben für bestimmte gentherapeutische Anwendungen Vorteile gegenüber viralen Vektoren (**Niidome, Huang 2002**) (siehe 3.).

Für eine erfolgreiche Gentherapie ist die Auswahl der therapeutischen Gene und der Vektoren als Expressionsvehikel von essentieller Bedeutung. In zunehmendem Maße werden für Gentherapie-Studien Vektorkonstrukte verwendet, deren Expression über bestimmte Faktoren reguliert werden kann. Hierzu werden induzierbare, konditionelle Promotoren in den Vektorkonstrukten eingesetzt, die u.a. durch Modalitäten der Tumorthherapie, wie Chemotherapie, Radiotherapie oder Hyperthermie regulierbar sind. Derartige Systeme einer konditionellen Expression therapeutischer Gene haben den Vorteil, das Genprodukt nach Bedarf in seiner Expression so zu induzieren, dass es für einen bestimmten Zeitraum in therapeutisch relevanten Konzentrationen zur Verfügung steht. Auf diese Weise ist eine direkte Kombination der Wirkungen des induzierenden Agens (Bestrahlung, Zytostatika, Hyperthermie etc.) und dem entsprechenden, zur Expression gelangenden therapeutischen Gen möglich.

Ein Beispiel für Therapie-induzierbare Vektorsysteme bietet die Verwendung des humanen Heat-Shock-Protein-70 (HSP70)-Promotors zur Regulation der Expression der Herpes-Simplex-Virus Thymidinkinase/Cytosindeaminase (HSV-TK/CD) Fusions-Suizidgene in einem adenoviralen Vektorsystem. Es konnte gezeigt werden, dass Hyperthermie die HSP70-Promotor-vermittelte Expression steigert und nach Gabe der Prodrug 5-Fluorocytosin zu einer Steigerung der zytotoxischen Wirkung in PC-3 Prostatakarzinomzellen führt (**Blackburn *et al.* 1998**). In einem anderen Modell (SKOV-

3) konnte durch Kopplung der Gene p53 oder Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) an den HSP70-Promotor ebenfalls die Hyperthermie-induzierte Expression dieser Gene in transfizierten Tumorzellen gezeigt werden (**Luna et al. 2000**). Aktuelle in vivo-Studien, die im adenoviralen Vektor die TNF- α -Expression mit Hilfe des HSP70-Promotors bei einer Hyperthermie regulieren, zeigen beachtenswerte therapeutische Effekte im Maus-Melanommodell (**Huang et al. 2000**).

Ein Beispiel eines weiteren induzierbaren Promotors ist das des Early Growth Response (Egr-1) Gens. Die Expression dieses Gens wird bei Bestrahlung in den betroffenen Zellen stimuliert, wobei ein Strahlen-responsibles Element diese Expressionsregulation vermittelt, das gezielt für die Expression von Fremdgenen, wie z. B. dem TNF- α , in viralen Vektoren eingesetzt worden ist. Es konnte in in vitro- und in vivo-Untersuchungen mit dem Egr-1-Promotor gezeigt werden, dass nach Bestrahlung transfizierter Tumoren die Expression des TNF- α -Gens signifikant gesteigert ist und somit zu einer verbesserten therapeutischen Wirkung von TNF- α im Kontext mit der Bestrahlung führt (**Hallahan et al. 1995**).

In das Konzept der Verwendung solcher "Therapie-induzierbarer" Vektoren in der Tumorgentherapie ordnet sich auch die Nutzung des Promotors des humanen Multidrug-Resistenz-Gen 1 (mdr1) ein. Es ist seit langem bekannt, dass die Expression des mdr1-Gens in Tumorzellen durch MDR-assoziierten Zytostatika, Hitzeschock, Arsenit, UV-Strahlung induzierbar ist und neben anderen regulatorischen Sequenzen auch über Zytostatika- und auch Hyperthermie-responsible Elemente verfügt (**Kohno et al. 1989, Chin et al. 1990, Stein et al. 1996, Stein et al. 2001**). Die Analyse definierter Abschnitte des mdr1-Promotors im Chloramphenicol-Azetyltransferase (CAT)-Reporter-Assay ergab, dass MDR-assoziierte Zytostatika (Vincristin, Actinomycin-D, Doxorubicin) und auch Hyperthermie in der Lage sind, die CAT-Expression zu induzieren. Die Verwendbarkeit des mdr1-Promotors für die Zytostatika- oder Hyperthermie-induzierte Expression therapeutisch relevanter Gene ist sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt worden (**Walther et al. 1997, Walther et al. 2000**).

1.3. Strategien zum nicht-viralen Gentransfer

In alternativen Ansätzen der Gentherapie wird versucht, die Nachteile vor allem der viralen Transfermethoden zu umgehen, gleichzeitig aber deren Transfereffizienzen zu erreichen. In diesem Zusammenhang gewinnt der Transfer unmodifizierter, also nackter DNA vor allem im Kontext der lokalen Gentherapie an Bedeutung (**Mölling 1997, Li et al. 2000**). Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht darin, dass bei der Verwendung nackter DNA keine infektiösen viralen Partikel verwendet werden, somit z.B. keine Immunreaktion auf virale Proteine auftreten kann und nicht die Gefahr der viralen

Rekombination besteht. Weiterhin ist der präparative Aufwand zum Transfer nackter DNA weitaus geringer, da z.B. keine spezifischen Verpackungen der DNA (z.B. Helferzellen für virale Verpackung, liposomale Verkapselung) vorgenommen werden müssen.

Für den nicht-viralen Transfer werden neben verschiedenen Varianten des liposomalen Gentransfers vor allem physikalische Technologien zum Einbringen von DNA in das Zielgewebe genutzt. Innerhalb des Vergleichs der Transfermethoden in der Gentherapie machen liposomale Technologien 23%, Gene-Gun und andere physikalische Methoden 9% aller Gentherapie-Protokolle weltweit aus. Zu den physikalischen Technologien zählt das Particle-Bombardment (Gene-Gun), mit dem DNA-beladene Micropartikel verschossen werden, die in vivo-Elektroporation, die Jet-Injection sowie die einfache Nadelinjektion von DNA. Bei allen diesen Methoden wird vorrangig nackte DNA für den Gentransfer in das Zielgewebe verwendet.

Derzeit wird in einer Vielzahl von Studien das Prinzip des Particle-Bombardments verwendet. (**Yang et al. 1990**). Die kommerzielle Verfügbarkeit solcher Particle-Bombardment Geräte ermöglicht den immer breiteren Einsatz dieser Methodik vor allem für DNA-Vakzinierungs-Strategien (**Sun et al. 1998**).

Die in vivo-Elektroporation hingegen nutzt den Effekt der kurzzeitigen Permeabilisierung von Zellmembranen im elektrischen Feld, die den Transfer von Fremd-DNA in das Gewebe ermöglicht (**Heller et al. 2000, Aihara et al. 1998, Nishi et al. 1996**). Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer nackter DNA in Gewebe mit Hilfe der in vivo-Elektroporation oder dem Particle-Bombardment für die Gentherapie geeignet ist. Mit Hilfe dieser Techniken konnten effektiv u.a. Zytokingene (TNF- α , IL-7, IL-12) in Tumoren appliziert und zur Expression gebracht werden, die dann zu einer Reduktion des Tumorwachstums führten (**Rackmilevich et al. 1996**). Selbst die einfache Applikation nackter DNA mittels der Nadelinjektion führt zur Expression des injizierten Gens, ist jedoch nicht für alle Gewebetypen geeignet (**Wolff et al. 1997, Zhang et al. 2000**). So ist diese Methode vor allem für die DNA-Immunisierung durch Injektion nackter DNA in das Muskelgewebe angewendet worden. Darüber hinaus wurde die einfache Nadelinjektion auch klinisch für den Gentransfer des Wildtyp-p53 Tumorsuppressorgens für die Gentherapie von Hepatozellulären-Karzinomen eingesetzt (**Habib et al. 1996**).

Eine andere Methode der Transduktion nackter DNA in Gewebe ist die Jet-Injection. Bei dieser Technik wird die DNA-Lösung als hochbeschleunigter Flüssigkeitsstrahl (High-Speed-Jet) unmittelbar in das Zielgewebe appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode effektiv Gene transferieren kann und für verschiedene Gewebearten anwendbar ist (**Furth et al. 1992, Kerr et al. 1996**). Jet-

injizierte Gewebe exprimieren das entsprechende Gen bereits 24 - 48 Stunden nach dem Transfer (**Furth et al. 1995**). Bisherige Jet-Injection-Geräte konnten zwar für den Gentransfer in vivo eingesetzt werden, hatten jedoch noch konstruktiv bedingte Nachteile, wie z.B. ein zu großes Ejektionsvolumen verbunden mit zu hohen DNA-Verlusten (**Vahlsing et al. 1994**). Die Entwicklung neuerer Geräte-Prototypen ermöglicht es, bei gleicher Transfereffizienz geringere Volumina an DNA-Lösungen applizieren zu können und machen diese Technologie somit auch für den klinischen Einsatz im Rahmen der Gentherapie anwendbar.

1.4. Gentherapie im Kontext konventioneller Tumorthérapien

Moderne Ansätze in der Gentherapie von malignen Erkrankungen setzen immer mehr auf solche Vektoren, die in ihrem Design den Spezifika der zu behandelnden Tumorerkrankungen Rechnung tragen. Das heißt, es werden für bestimmte Tumorlokalisationen und ihre jeweiligen Behandlungen (Strahlentherapie, Chemotherapie, Hyperthermie) spezifische Vektoren zu Verfügung stehen, deren Ziel die effiziente Kombination der Gentherapie mit der jeweiligen Tumorthérapie ist.

Die Stellung der Tumorgentherapie im Gesamtkontext der Behandlung von Tumorpacienten hat sich in den letzten Jahren relativiert, nicht zuletzt durch die Erfahrungen aus bisher durchgeführten Phase I und II Gentherapie-Studien. Dabei zeichnet sich ab, dass die Tumorgentherapie nicht als alleinige Therapieform die gewünschten Ergebnisse erbringen wird, sondern ihr Potential in der Kombination mit konventionellen Therapien, wie der Chemotherapie, Radiotherapie, Hyperthermie oder Immuntherapie entfaltet. Diese Kombinationsstrategie zielt z.B. auf die Verbesserung der Wirksamkeit von Chemo- oder Strahlentherapie durch Transfer pro-apoptotischer und Tumor-sensitiverender Gene, wie p53, bax, bcl-X_s, APO/CD95 aber auch durch Transfer von Suizidgenen ab. Erste Schritte in diese Richtung sind bereits gemacht und es wird z.B. der Transfer des p53 Gens oder auch von Zytokingenen wie dem TNF- α oder IL-2 gezielt für die Chemo- oder auch Radiosensitivierung von Tumoren eingesetzt (**Chang et al. 2000, Piche et al. 2001**). Klinisch ist der p53 Gentransfer für die Sensitivierung von Lungenkarzinom-Pacienten für den kombinierte Anwendung von Cisplatin genutzt worden (**Roth et al. 1996**). Parallel dazu konnte basierend auf in vitro- und in vivo-Untersuchungen auch das chemo- und radiosensitivierende Potential des bcl-X_s, bax- oder CD95-Gentransfers gezeigt werden. Neben der immunstimulatorischen Wirkung von Zytokinen ist seit einiger Zeit bekannt, dass Kombinationen von Zytokinen mit konventionellen Zytostatika und auch Hyperthermie additive oder synergistische Steigerungen der Antitumoraktivität bewirken können (**Lin et al. 1996, Klostergaard et al. 1996**).

Diese Daten zeigen, dass die Tumorgentherapie als eine zusätzlich therapeutische Modalität in Ergänzung bereits etablierter Therapien eingesetzt werden kann. Gerade für eine solche Strategie sind konditionelle Vektorsysteme von Interesse, die einerseits durch Chemotherapie, Strahlentherapie oder Hyperthermie regulierbar sind und andererseits Gene exprimieren, die diese Therapien in ihrer Wirksamkeit steigern können. Auf diese Weise gelingt es, die Chemotherapie, Strahlentherapie und Hyperthermie effizienter und möglicherweise ärmer an Nebenwirkungen zu gestalten sowie Therapieresistenzen zu überwinden.

Nach nur etwas mehr als zehn Jahren in der Anwendung der Gentherapie sind wesentliche Erkenntnisse erworben und wichtige Schritte in der Erarbeitung klinisch nutzbarer Konzepte gemacht worden. Es ist sicher zu erwarten, dass die Gentherapie auf dem Wege ist, sich seinen Platz in der modernen Behandlung von Tumorerkrankungen zu sichern.

2. FRAGESTELLUNG

Die Gentherapie hat in den letzten Jahren wesentliche Entwicklungen im Design der verschiedenen Vektoren für die spezifische Applikation, die kontrollierte Expression sowie der Sicherheit ihrer Anwendung durchgemacht. Die Erkenntnis, dass die Tumorgentherapie allein nur in begrenztem Maße zum erhofften therapeutischen Benefit für den Patienten beitragen kann, führte in neueren Therapieansätzen zum Konzept der lokalen Gentherapie als Teil anderer, etablierter Tumorthapien. In diesem Zusammenhang wird die Gentherapie als eine moderne Option zur Steigerung der Effizienz von Chemotherapie, Strahlentherapie oder Hyperthermie verstanden. Zum Erreichen dieses Zieles ist die Etablierung Therapie-regulierbarer Vektorsysteme von besonderer Attraktivität. Im Rahmen der Strategie des lokalen Transfers therapeutischer Gene bietet inzwischen die Anwendung nicht-viraler Transfersysteme, wie z.B. in vivo-Elektrotransfer, Gene-Gun oder Jet-Injection eine klinisch applikable Technologie.

Die Etablierung einer effizienten, auf der Jet-Injection basierenden nicht-viralen Transfertechnologie und die Analyse ihres Potentials für eine klinische Anwendung in einem multimodalen Therapiekonzept war ein wesentliches Ziel der Arbeit.

Basierend auf der Strategie des Einsatzes der Gentherapie in Kombination mit anderen Therapien, bestand ein weiteres Ziel der Arbeit in der Charakterisierung und Anwendung konditioneller Vektorsysteme, mit denen die Expression therapeutischer Gene durch Chemotherapie oder Hyperthermie kontrollierbar ist. Derartige Vektoren sollen der Expression solcher Gene dienen, die vor allem die therapeutische Effizienz von Zytostatika oder der Hyperthermie verbessern.

Hieraus ergaben sich die experimentellen Schwerpunkte, die durch die einzelnen Arbeiten repräsentiert sind:

1. Die Etablierung eines nicht-viralen Gentransfer-Systems mit Hilfe der Jet-Injection als Voraussetzung für eine effiziente lokale Tumorgentherapie unter Verwendung „nackter“ DNA. Im Rahmen dieser Zielstellung werden in den **Abschnitten 3.1. – 3.4.** die Applikabilität der Jet-Injection-Technologie sowie die Identifikation und Optimierung der essentiellen Parameter für einen effektiven in vivo Gentransfer untersucht.

2. Der kritische Vergleich nicht-viraler und viraler Transfersysteme im Rahmen einer Einschätzung von Effektivität und Sicherheit für die jeweilige Applikation. In diesem Zusammenhang werden in den **Abschnitten 4.1. und 4.2.** Untersuchungen zu

liposomalen und retroviralen Transfersystemen und deren Potential für den in vitro und in vivo Gentransfer vorgestellt.

3. Die Konstruktion, Analyse und der Einsatz von Chemotherapie- oder Hyperthermie-induzierbaren Vektoren für die regulierbare Expression therapeutischer Gene im Tumorgewebe. Derartige Vektoren sollen im Kontext einer Kombination von Gentherapie und Chemotherapie und/oder Hyperthermie eingesetzt werden. Hierzu werden in den **Abschnitten 5.1. – 5.6.** detaillierte Untersuchungen zur Charakterisierung sowie in vitro- und in vivo-Anwendung von Vektorsystemen dargestellt, die konditionelle Therapie-induzierbare Promotoren tragen.

4. Die Auswahl solcher therapeutischer Gene, die die Effektivität der Chemotherapie durch Sensitivierung der transduzierten Tumoren steigern können. Die **Abschnitte 6.1. – 6.4.** gehen besonders auf das chemosensitivierende Potential von Zytokinen, wie TNF- α , IL-2 oder IFN- γ über den Mechanismus der MDR-Modulation in in vitro- und auch in vivo-Modellen ein.

LITERATUR

Aihara H, Miyazaki JI (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nature Biotechnol.* 16: 867 - 870.

Alvarez RD, Curiel DT (1997) A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated intraperitoneal delivery of herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene and intravenous ganciclovir for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Hum. Gene Ther.* 8: 597 - 613.

Anderson WF (1992) Human gene therapy. *Science* 256: 808 - 813.

Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235 - 248.

Blackburn RV, Galoforo S, Corry PM, Lee YJ (1998) Adenoviral mediated transfer of a heat inducible double suicides gene into prostate carcinoma. *Cancer Res.* 58: 1358 - 1362.

Chang EH, Pirolo KF, Bouker KB (2000) Tp53 gene therapy: a key to modulating resistance to anticancer therapies? *Mol. Med. Today* 6: 358 - 364.

Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesmann MM (1990) Heat shock and asenite increase expression of the multidrug resistance gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 265: 221 - 226.

Furth PA, Kerr D, Wall R (1995) Gene transfer by jet injection into differentiated tissues of living animals and in organ culture. *Mol. Biotechnol.* 4: 121 - 127.

Furth PA, Shamay A, Wall RJ, Henninghausen L (1992) Gene transfer into somatic tissues by jet injection. *Anal. Biochem.* 205: 365 - 368.

Gewirtz A, Sokol DL, Ratajczak M (1998) Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects. *Blood* 92: 712 - 736.

Habib NA, Ding SF, El-Masry R, Mitry RR, Honda K, Michail NE, Della Serra G, Izzi G, Greco L, Bossyouni M, El-Toukhy M, Abdel-Ghaffar Y (1996) Preliminary report: the short term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect. & Preven.* 20: 103 - 107.

Hallahan DE, Mauceri HJ, Seung LP, Dunphy EJ, Wayne JD, Hanna NN, Toledano A, Hellman S, Kufe DW, Weichselbaum RR (1995) Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Gene Ther.* 1: 170 - 175.

Heller L, Jaroszesky MJ, Coppola D, Pottinger C, Gilbert R, Heller R (2000) Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas in vivo. *Gene Ther.* 7: 826 - 829.

Huang Q, Hu JK, Lohr F, Zhang L, Braun R, Lanzen J, Little JB, Dewhirst MW, Li CY (2000) Heat-induced gene expression as a novel targeted cancer therapy strategy. *Cancer Res.* 60: 3435 - 3439.

Kerr DE, Furth PA, Powell RJ, Wall RJ (1996) Expression of gene-gun injected plasmid DNA in the ovine mammary gland and in lymph nodes draining the injection site. *Animal Biotechnol.* 7: 33 - 45.

- Kijima H, Ishida H, Ohkawa T, Kashani-Sabet M, Scanlon KJ (1995) Therapeutic applications of ribozymes. *Pharmacol. Ther.* 68: 247 - 267.
- Klostergaard J, Leroux ME, Hsu HA, Hsi BP, Siddik ZH, Danhauser LL, Tomasovi SP (1996) Multi-chemothermoimmunotherapy for human colon adenocarcinoma in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37: 235 - 237.
- Kohno K, Sato S, Takano H, Matsuo K, Kuwano M (1989). The direct activation of human multidrug resistance gene (mdr1) by anticancer agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 1415 - 1421.
- Li S, Huang L (2000) Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* 7: 31 - 34.
- Lin JC, Park HJ, Song CW (1996) Combined treatment of IL-1 alpha and TNF-alpha potentiates the antitumor effects of hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 12: 335 - 344.
- Luger S (2000) c-myc antisense oligonucleotide therapeutics for hematologic malignancies. In: Walther W, Stein U, editors. *Gene Therapy of Cancer: Methods and Protocols*. 1st ed. Totowa, NJ; Humana Press; pp.: 577 - 592.
- Luna MC, Ferrario A, Wong S, Fisher A M, Gomer CJ (2000) Photodynamic therapy-mediated oxidative stress as a molecular switch for the temporal expression of genes ligated to the human heat shock promoter. *Cancer Res.* 60: 1637 - 1644.
- Mölling K (1997). Naked DNA for vaccine or therapy *J. Mol. Med.* 75: 242 - 246.
- Mullen CA, Kilstrup M, Bleasby M (1992) Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 33 - 37.
- Nettelbeck DM, Jerome V, Müller R (2000) Designer promoters for tumor targeting. *Trends Genet.* 16: 174 - 181.
- Niido T, Huang L (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther.* 9: 1647 - 1652.
- Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, Takeshima H, Sato K, Hamada K, Kitamura I, Yoshimura T, Saya H, Kuratsu JI, Ushio Y (1996) High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. *Cancer Res.* 56: 1050 - 1055.
- O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Gallagher M, Cassella A, Vasilevskaya I, Monia BP, Holmlund J, Dorr FA, Yao KS (1999) c-raf-1 depletion and tumor responses in patients treated with the c-raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clin. Cancer Res.* 5: 3977 - 3982.
- Piche A, Rancourt C (2001) Gene therapy to overcome drug resistance in cancer: targeting key regulators of the apoptotic pathway. *Curr. Gene Ther.* 1: 317 - 324
- Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR (1997) The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur. J. Cancer* 33: 1005 - 1016.

Rackmilevich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM, Grota K, Yang NS (1996) Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 6291 - 6296.

Roth JA (1996) Clinical protocol: modification of tumor suppressor gene expression and induction of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) with an adenovirus vector expression wild-type p53 and cisplatin. *Hum. Gene Ther.* 7: 1013 - 1030.

Roth JA et al. (1996) Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumor of patients with lung cancer. *Nat. Medicine* 2: 985 - 991.

Roth JA, Swisher SG, Meyn RE (1999) p53 tumor suppressor gene therapy of cancer. *Oncology* 13: 148 - 154.

Stein U, Jürchott K, Walther W, Bergmann S, Schlag PM, Royer H-D (2001) Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters. *J. Biol. Chem.* 276: 28562 - 28569.

Stein U, Walther W, Shoemaker RH (1996) Vincristine induction of mutant and wild type human multidrug-resistance promoters is dose-dependent and cell type specific. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 275 - 282.

Sun Y, Jurgovsky K, Moller P, Alijagic S, Dorbic T, Georgieva J, Wittig B, Schadendorf D (1998) Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. *Hum. Gene Ther.* 5: 481 - 490.

Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB Jr, Richli WR, Savin M, Waugh MK et al. (1999) Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91: 763 - 771.

Uchiumi T, Kohno K, Tanimura H, Hidaka K, Asakuno K, Abe H, Uchida Y, Kuwano M (1993) Involvement of protein kinase in environmental stress-induced activation of human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter. *FEBS Lett.* 326: 11 - 16.

Vahlsing HL, Yankauckas MA, Sawdey M, Gromkowski SH, Manthorpe M (1994) Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *J. Immunol. Methods* 175: 11-22.

Walther W, Stein U (2000) Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs* 60: 249-271.

Walther W, Stein U, Fichtner I, Alexander M, Shoemaker RH, Schlag PM (2000) mdrl promoter driven TNF α -expression for a chemotherapy-controllable combined in vivo gene- and chemotherapy of tumors. *Cancer Gene Ther.* 7: 893 - 900.

Walther W, Stein U, Schlag PM (2002) Use of the human mdrl promoter for heat-inducible expression of therapeutic genes. *Int. J. Cancer* 98: 291 - 296.

Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, Corbo M, Dziekanowska Z. (1997) BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 349: 1137 - 1141.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465 - 1468.

Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, McCabe D (1990) In vivo and in vitro gene transfer to mammalian cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 9568 - 9572.

Zhang G, Song YK, Liu D (2000) Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther.* 7: 1344 - 1349.

3. DIE JET-INJECTION TECHNOLOGIE FÜR DEN NICHT-VIRALEN IN VIVO GENTRANSFER IN TUMOREN

3.1.

In vivo gene transfer by low-volume jet injection

Cartier R, Ren SV, Walther W, Stein U, Lewis A, Schlag PM, Li M, Furth PA
Anal. Biochem. 282: 262-265, 2000.

3.2.

Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology

Walther W, Stein U, Fichtner I, Malcherek L, Lemm M, Schlag PM
Gene Ther. 8: 173-180, 2001.

3.3.

Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer

Walther W, Stein U, Fichtner I, Voss C, Schmidt T, Schleef M, Nellessen T, Schlag PM
Mol. Biotechnol. 21: 105-115, 2002.

3.4.

Stability analysis for long term storage of naked DNA: impact on non-viral in vivo gene transfer

Walther W, Stein U, Voss C, Schmidt T, Schleef M, Schlag PM
in Revision 2003.

4. UNTERSUCHUNGEN ZUM RETROVIRALEN UND LIPOSOMALEN GENTRANSFER VON TUMORZELLEN

4.1.

Lipoplexes with alkylphospholipid as a new helper lipid for efficient in vitro and in vivo gene transfer in tumor therapy

Zeisig R, Ress A, Fichtner I, Walther W

Cancer Gene Ther.: im Druck, 2003.

4.2.

Influence of retrovirally transduced human tumor necrosis factor- α on the expression of c-myc, K-ras, c-jun, p53, TGF α and CEA in human colon carcinoma cell lines

Uckert W, Walther W, Hummel O

Int. J. Oncol. 6: 1027-1031, 1995.

5. CHARAKTERISIERUNG UND NUTZUNG THERAPIE-INDUZIERBARER PROMOTOREN FÜR EINE KONDITIONELLE TUMORGENTHERAPIE

5.1.

Cell type specific and inducible promoters for vectors in gene therapy as an approach for cell targeting

Walther W, Stein U

J. Mol. Med. 74: 379-392, 1996.

5.2.

Vincristine induction of mutant and wild-type human multidrug-resistance promoters is cell-type-specific and dose-dependent

Stein U, Walther W, Shoemaker RH

J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 275-282, 1996.

5.3.

Employment of the *mdr1* promoter for the chemotherapy-inducible expression of therapeutic genes in cancer

Walther W, Wendt J, Stein U

Gene Ther. 4: 544-552, 1997.

5.4.

mdr1 promoter driven tumor necrosis factor- α expression for a chemotherapy-controllable combined in vivo gene therapy and chemotherapy of tumors

Walther W, Stein U, Fichtner I, Alexander M, Shoemaker RH, Schlag PM

Cancer Gene Ther. 7: 893-900, 2000.

5.5.

Use of the human *mdr1* promoter for heat-inducible expression of therapeutic genes

Walther W, Stein U, Schlag PM

Int. J. Cancer 98: 291-296, 2002.

5.6.

Cloning and initial analysis of the human multidrug resistance-related MVP/LRP gene promoter

Lange C, Walther W, Schwabe H, Stein U

Biophys. Biochem. Res. Comm. 278:125-133, 2000.

6. CHEMOSENSITIVIERUNG ALS STRATEGIE FÜR DIE GENTHERAPIE VON TUMOREN

6.1.

Modulation of *mdr1* expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance

Stein U, Walther W, Shoemaker RH

Br. J. Cancer 74: 1384-1391, 1996.

6.2.

Reversal of multidrug resistance by transduction cytokine genes into human colon carcinoma cells

Stein U, Walther W, Shoemaker RH.

J. Natl. Cancer Inst. 88: 1383-1392, 1996.

6.3.

Tumor necrosis factor- α and expression of the multidrug resistance-associated genes LRP and MRP

Stein U, Walther W, Laurencot CM, Scheffer GL, Scheper RJ, Shoemaker RH

J. Natl. Cancer Inst. 89: 807-813, 1997.

6.4.

Gene transfer of human TNF α into glioblastoma cells permits modulation of *mdr1* expression and potentiation of chemosensitivity

Walther W, Stein U, Pfeil D

Int. J. Cancer 61: 832-839, 1995.

7. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

7.1. Die Jet-Injection Technologie für den nicht-viralen in vivo Gentransfer in Tumoren

Als wichtige Voraussetzung für einen lokalen Gentransfer kann die Etablierung einer effizienten und sicheren Gentransfertechnologie gelten. Alternativ zu anderen in vivo-Transfertechnologien, wie dem Elektrotransfer oder der Gene-Gun (Particle Bombardment) wurde im Rahmen der Problemstellung das für die Tumorgentherapie neuartige Transfersystem der Jet-Injection eingesetzt und für die nicht-virale in vivo-Anwendung optimiert. Diese Untersuchungen an verschiedenen Mausmodellen und humanen Xenotransplantat-Modellen sind in den Arbeiten der Abschnitte **3.1 – 3.4.** detailliert dargestellt.

Als Voraussetzung für die Untersuchungen zum Jet-Injection vermittelten Gentransfer als Technologie für die Gentherapie musste die Auswahl eines geeigneten Jet-Injector Prototyps erfolgen. Im **Abschnitt 3.1.** (Cartier et al. 2000) wurden hierzu vergleichende Analysen der kritischen Parameter, wie Gentransfereffizienz, Jet-Kinetik, Einfluß der Jet-Injection auf die Integrität der DNA für fünf verschiedene Jet-Injectoren sowie der einfachen Nadelinjektion angestellt. Im Ergebnis hat sich gezeigt, dass der Low-Volume Jet-Injector in Bezug auf seine Gentransfereffizienz z.B. im Luziferase-Reporter Assay und seine Handhabbarkeit am besten für den in vivo Gentransfer nackter DNA geeignet ist und damit auch die günstigsten Voraussetzungen für seinen Einsatz im Rahmen der Tumorgentherapie bietet.

In **Abschnitt 3.2.** (Walther et al. 2001) werden die Ergebnisse des Low-Volume Jet-Injection-Gentransfers in verschiedenen in vivo-Tumormodellen der Maus (B16-Melanom, Lewis-Lung-Karzinom) sowie humanen Xenotransplantat-Modellen des Mammakarzinoms dargestellt. Hierbei konnte mit Hilfe unterschiedlicher Reportersysteme, wie dem Green Fluorescence Protein (GFP) oder der β -Galactosidase (LacZ) die Reproduzierbarkeit in der Effizienz des intratumoralen Jet-Injection-Gentransfers nachgewiesen werden. Parameter, wie Applikationsdruck, Formulierung der DNA, die Penetration des Jets und Verteilung der GFP-oder LacZ-Reportergen Expression im Tumorgewebe konnten abgeklärt werden. Darüber hinaus belegten die in vivo-Untersuchungen, dass die einmalige Jet-Injection TNF- α Gen-tragender nackter DNA-Konstrukte zur Expression dieses Zytokins von bis zu 120 Stunden führt. Mögliche Nebenwirkungen dieser Technologie, wie vor allem eine potentielle Jet-bedingte Tumorzellverschleppung und ein damit verbundenes höheres Metastasierungsrisiko,

konnten in den Untersuchungen ausgeschlossen werden. Im Ergebnis bestätigen diese tierexperimentellen Arbeiten die Verwendbarkeit der Jet-Injection für die sichere nicht-virale Tumorgentherapie unter Nutzung geringer Mengen von Plasmid-DNA.

In Fortführung der im Abschnitt 3.2. dargestellten Experimente sind im **Abschnitt 3.3.** (Walther et al. 2002) jene Parameter der intratumoralen in vivo-Jet-Injection ausführlich analysiert worden, die signifikanten Einfluss auf die Transfereffizienz haben können. Unter Verwendung der GFP- und LacZ-Reportergene sowie dem humanen TNF- α -Gen konnte die Korrelation zwischen Jet-Volumen, dem applizierten Druck der Jet-Injektion und der jeweiligen Transfereffizienz in Maus-Tumormodellen und humanen Xenotransplantat-Modellen des Kolon- sowie Mammakarzinoms definiert werden. Sie bilden die Grundlage für die optimalen Bedingungen eines reproduzierbar guten Jet-Injection Gentransfers. Ergänzt wurden diese Untersuchungen durch quantitative und qualitative Analysen der Jet-injizierten nackten Plasmid-DNA mit Hilfe der Kapillar-Gelelektrophorese, die belegen, dass die Topologie der geschlossen-zirkulären Plasmid-DNA in nur geringem Umfang durch mögliche Scherkräfte des Jets verändert wird und somit keinen signifikanten Einfluss auf die Transfereffizienz hat.

In **Abschnitt 3.4.** (Walther et al. 2003) wird auf die Problematik der Stabilität von Plasmid-DNA bei Langzeitlagerung eingegangen. Diese Analyse ist von Interesse, da beim potentiellen klinischen Einsatz nackter DNA in Gentherapie-Studien die Konstanz der DNA-Qualität über längere Zeit gewährleistet werden muss. Die mit Hilfe der Kapillar-Gelelektrophorese durchgeführte Analyse von bis zu 13 Monate gelagerter DNA zeigte, dass vor allem die Lagerung bei -80°C im Vergleich zu einer Lagerung bei $+4^{\circ}\text{C}$ zur Stabilisierung der Topologie der Plasmid-DNA beiträgt. Bei Verwendung dieser DNA für die in vivo-Jet-Injection konnte die Reproduzierbarkeit der Gentransfereffizienz nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen bestätigen weiterhin die Bedeutung der Qualitätskontrolle von für die Gentherapie verwendeter DNA und der stabilen Lagerungsbedingungen für die Qualitätssicherung als wichtige Voraussetzung klinischer Studien.

7.2. Untersuchungen zum retroviralen und liposomalen Gentransfer in Tumorzellen

In Anlehnung an die Arbeiten zum Jet-Injection-Gentransfer für die Tumorgentherapie, werden in den **Abschnitten 4.1.** und **4.2.** Arbeiten zum liposomalen und retroviralen Gentransfer vorgestellt. Diese Arbeiten zeigen die Möglichkeiten dieser

Transfertechnologien auf und sind im Kontext der Bemühungen um einen effizienten Gentransfer in der Tumorgentherapie zu sehen.

In **Abschnitt 4.1.** (Zeisig et al. 2003) wird die in vitro- und in vivo-Testung eines neuartigen Lipoplexes beschrieben, der für den Gentransfer Alkylphospholipide verwendet, die die Membraneigenschaften von Zellen maßgeblich beeinflussen können und auch antitumorale Wirkungen entfalten. Unter Verwendung des LacZ-Reportersystems konnte in vitro in HCT15 und HCT116 Zellen die optimale Komposition von Alkylphospholipid-haltigen Lipoplexen für den Gentransfer ermittelt werden. Basierend auf diesen in vitro-Experimenten wurden tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt, bei denen mit Hilfe des LacZ-Reportergens die in vivo-Transfereffizienz qualitativ und quantitativ demonstriert werden konnte. Zur Testung der therapeutischen Potenz dieses liposomalen Transfersystems, wurde das bakterielle Cytosindeaminase (CD)-Suizidgen intratumoral im C26 Kolonkarzinom-Modell appliziert. Dieses CD-Gen konvertiert das nicht-toxische 5-Fluorocytosin (5-FC) in den toxischen Antimetaboliten 5-Fluorouracil. Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen konnte nach einmaligem liposomalen CD-Gentransfer die Reduktion des Tumorwachstums in den transduzierten, 5-FC behandelten Tieren beobachtet werden. Diese Arbeiten weisen auf die Möglichkeiten des liposomalen in vivo Gentransfers zur effektiven Tumorthherapie hin.

Abschnitt 4.2. (Uckert et al. 1995) beschreibt den retroviralen in vitro Transfer des TNF- α -Gens in LS174T- und in LoVo-Kolonkarzinomzellen und die Auswirkungen der TNF- α -Expression auf die Expression der Tumor-assoziierten Gene c-myc, K-ras, c-jun, p53, dem Transforming Growth Factor alpha (TGF α) und dem Carcinoembryonalen Antigen (CEA). Die Analyse der Expression dieser Gene mit Hilfe des RNA-slot blots und der Immunhistochemie ergab, dass vor allem die CEA-Expression signifikant durch TNF- α reduziert wurde, die anderen Gene jedoch weitgehend unbeeinflusst blieben. Der Vergleich dieser Ergebnisse zu nicht-transduzierten Kolonkarzinomzellen, die mit rekombinantem TNF- α behandelt wurden zeigte, dass hierbei bereits nach 2 Stunden der Zytokineinwirkung die Genexpression von TGF α und c-jun erhöht war, während p53, K-ras und auch c-myc unbeeinflusst blieben. Einerseits konnte mit dieser Arbeit der effiziente retrovirale Transfer des TNF- α -Gens demonstriert werden, andererseits wurde der Einfluss des Zytokingentransfers auf die komplexen Expressionsmuster der Tumorzellen gezeigt, die u.a. Wachstumsverhalten, Malignität etc. beeinflussen.

7.3. Charakterisierung und Nutzung Therapie-induzierbarer Promotoren für eine konditionelle Tumorgentherapie

Neben dem lokalen und damit auf den Tumor begrenzten Gentransfer stellt die regulierte Expression der therapeutischen Gene in den Tumorzellen ein wichtiges Moment in der Optimierung der Tumorgentherapie dar. Zur Realisierung der Therapie-induzierbaren Genexpression wurden gezielt Promotoren humaner Multidrug Resistenz-Gene (MDR) verwendet, die auf Therapie-assoziierte Faktoren wie Zytostatika oder Hyperthermie ansprechen und somit geeignete Regulationseinheiten für konditionelle Vektoren darstellen. In den Abschnitten **5.1.** – **5.6.** sind die molekularbiologischen Charakterisierungen des humanen Multidrug Resistenz-Gen-1 (*mdr1*) und Major Vault Protein/Lung Resistance Protein (MVP/LRP) Promotors sowie die erfolgreiche in vitro und in vivo-Nutzung des *mdr1* Promotors für die induzierbare konditionelle Genexpression dargelegt.

In dem **Abschnitt 5.1.** (Walther and Stein 1996) wird ein Überblick über die Strategien zum transkriptionellen Targeting gentherapeutischer Vektoren gegeben. Hierbei steht vor allem gentherapeutische Ansätze im Vordergrund, bei denen die Selektivität der Genexpression durch Einsatz Zelltyp-spezifischer Promotoren erreicht werden soll. Weiterhin werden Ansätze zur konditionellen, regulierbaren Expression therapeutischer Gene unter Verwendung induzierbarer Promotoren diskutiert. Diese Arbeit belegt die Bedeutung spezifischer und regulierbarer Expressionssysteme für die auf das Krankheitsbild orientierte und selektive Anwendung der Gentherapie.

In Hinblick auf die Zielstellung des Einsatzes konditioneller Promotoren für die Konstruktion von Expressionsvektoren, bildeten die in **Abschnitt 5.2.** (Stein et al. 1996) beschriebenen Untersuchungen die Grundlage zur Nutzung des humanen *mdr1*-Genpromoters. In diese Untersuchungen wurden sowohl der Wildtyp-Promotor, als auch Mutationsvarianten des *mdr1*-Promotors auf ihre Induktionseigenschaften und ihre Promotoraktivität in Abhängigkeit vom intrinsischen MDR-Expressionsstatus der Kolonkarzinomzelllinien KM12 (niedrig) und HCT15 (hoch) im Chloramphenikol-Azetyltransferase (CAT)-Assay untersucht. Bei den Mutationsvarianten handelt es sich um *mdr1*-Promotorsequenzen (-207 bis +158), die an Position +103 durch T/C Transition oder aber an Position +137 durch G/T Transversion verändert sind, und aus Tumormaterial von Osteosarkom-Patienten mit unterschiedlicher intrinsischer *mdr1*-Expression isoliert wurden. Für die Induktion der *mdr1*-Promotorvarianten wurde das MDR-assoziierte Zytostatikum Vincristin in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Untersuchungen ergaben die signifikante konzentrationsabhängige Induktion des *mdr1* Promotors durch Vincristin. Hierbei wurde deutlich, dass im Vergleich zum

Wildtyp *mdr1* Promotor, die mutierten Promotoren deutlich bessere Induktionseigenschaften aufwiesen, wobei vor allem die Mutation an Position +103 zur höchsten Induktion der CAT-Expression durch Vincristin führte. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die *mdr1*-Promotoraktivität in Abhängigkeit der intrinsischen *mdr1*-Expression variiert, also in den HCT15 Zellen am stärksten ist, da sie die höchste intrinsische *mdr1* Expression aufweisen. Mit der Arbeit konnte daher sowohl die Zytostatika-Induzierbarkeit, als auch erstmals die Zelltyp-spezifische Aktivität des humanen *mdr1*-Promotors nachgewiesen werden.

In **Abschnitt 5.3.** (Walther et al. 1997) wird die in vitro-Nutzung des humanen *mdr1*-Promotors für die Zytostatika-induzierbare Expression des humanen TNF- α -Gens beschrieben. Für die Konstruktion des konditionellen Expressionsvektors wurde aufgrund der beobachteten hohen Effizienz der an Position +103 mutierten Promotorvariante, diese Sequenz zur Kontrolle der TNF- α -Genexpression verwendet. Die Expressionsstudien in stabil transfizierten MCF-7-Mammakarzinomzellen und HCT116-Kolonkarzinomzellen zeigten die zeit- und konzentrationsabhängige, 2- bis 10-fache Induktion der *mdr1*-Promotor-gesteuerten TNF- α -Expression durch die Zytostatika Doxorubicin, Vincristin und Taxol auf mRNA- und Proteinebene. Die therapeutische in vitro-Effizienz der Doxorubicin-induzierten TNF- α -Expression in transduzierten MCF-7-Zellen konnte durch die signifikante Steigerung der Zytotoxizität belegt werden. Damit stellt diese Arbeit einen wichtigen Nachweis der Verwendbarkeit des *mdr1*-Promotors für eine konditionelle Tumorgentherapie im Kontext der Chemotherapie dar.

In **Abschnitt 5.4.** (Walther et al. 2000) wurde in vivo die Zytostatika-Induktion durch Vincristin und Doxorubicin im stabil transfizierten MCF-7-Mammakarzinom-Modell untersucht. Diese Tumoren trugen das Vektorkonstrukt, bei dem der *mdr1*-Promotor die Expression des TNF- α -Gens kontrolliert. Bei Induktion durch einmalige Applikation der Zytostatika Vincristin oder Doxorubicin konnte in allen Tieren die signifikante zeitabhängige Induktion der Zytokinexpression auf der Proteinebene 24 bzw. 48 Stunden nach Zytostatikagabe beobachtet werden. Die Analyse auf der mRNA-Ebene ergab bereits 4 Stunden nach Zytostatika-Applikation für beide Zytostatika eine Induktion der TNF- α -Genexpression. Unter Verwendung desselben MCF-7-Tumormodells wurde in einem therapeutischen Ansatz der Vergleich der therapeutischen Effizienz der konstitutiven, Cytomegalovirus-(CMV)-Promotor-gesteuerten Expression sowie der *mdr1*-Promotor-regulierten, konditionellen TNF- α -Expression im Kontext einer Behandlung mit Doxorubicin angestellt. Diese Untersuchungen ergaben, dass die CMV-gesteuerte Zytokinexpression zwar zu einer leichten Reduktion des Tumorwachstums

fürte, die jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu war in der Tiergruppe, in der die TNF- α -Expression unter der *mdr1*-Promotorkontrolle stand, eine dramatische Reduktion des Tumorwachstums nach Doxorubicin-Applikation zu beobachten. Diese *in vivo*-Untersuchungen konnten daher die Zytostatika-Induzierbarkeit des *mdr1*-Promotors auf mRNA- und auf Proteinebene und die therapeutische Effektivität des Chemotherapie-induzierbaren Vektorsystems im Rahmen einer Kombinationstherapie bestätigen.

Bisherige Untersuchungen zeigten die *in vitro*- und vor allem *in vivo*-Nutzbarkeit der Zytostatika-responsiblen Elemente des *mdr1*-Promotors für die konditionelle Tumorgentherapie. Neuere Analysen des Promotors konnten darüber hinaus auch Hitze-responsible Elemente identifizieren. In **Abschnitt 5.5.** (Walther et al. 2002) wird daher die *mdr1* Promotoranalyse in Hinblick auf die Hitze-Induzierbarkeit und die Nutzung für die Expression von TNF- α *in vitro* in HCT15- und HCT116-Kolonkarzinomzellen dargestellt. Die CAT-Reportergen-Analyse der Hitze-Induktion des *mdr1*-Promotors bei 41.5°C und 43°C ergab die signifikante Steigerung der CAT-Expression durch die Hyperthermie. Daher wurde im zweiten Schritt die Hyperthermie-Induktion der *mdr1* Promotor-gesteuerten TNF- α -Expression im selben HCT15- und HCT116-Kolonkarzinomzell-Modell überprüft. Auch hierbei konnte die zeit- und temperaturabhängige, bis zu 7-fache Induktion der Zytokin-Expression beobachtet werden. Die antitumorale Effektivität der Hyperthermie-induzierten TNF- α -Expression im Kontext einer Adriamycin- oder Vincristin-Behandlung zeigte seine signifikante Überlegenheit im Vergleich zu den nicht hyperthermierten, transduzierten Zellen. Mit diesen Befunden konnte somit die vielseitige Nutzung des *mdr1*-Promotors in einem multimodalen Therapiekonzept belegt werden.

Abschnitt 5.6. (Lange et al. 2000) beschreibt die erstmalige Isolierung, genomische Organisation und Charakterisierung des Major Vault Protein/Lung Resistance Protein (MVP/LRP)- Genpromotors, der für die Regulation dieses Resistenz-Gens verantwortlich ist. Im CAT-Reporter Assay konnte für die 1.9 kb bzw. 0.7 kb lange 5'-flankierende nicht-translatierte Region des MVP/LRP-Gens eine eindeutige Promotoraktivität nachgewiesen werden. Die Sequenzanalyse dieser Promotorregion zeigte potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1, YB-1 (Y-Box) und p53. Sie bestätigen die Funktion dieser 5'-flankierenden Region als Promotor und geben mögliche Anhaltspunkte für die Expressionsregulation dieses Resistenzgens. Vor allem die Existenz von Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren YB-1 und p53 weisen auf die Potenz dieser MVP/LRP-Promotorsequenz hin, als Regulationseinheit für die

konditionelle Expression therapeutischer Gene im Rahmen der Tumorgentherapie genutzt zu werden.

7.4. Chemosensitivierung als Strategie für die Gentherapie von Tumoren

Die Auswahl effizienter therapeutische Gene, die in einer Tumorgentherapie zur Expression gebracht werden sollen, ist entscheidend für den therapeutischen Effekt. Genprodukte, die im Kontext mit der Chemotherapie oder Hyperthermie ihre biologische Aktivität entfalten bzw. die Effizienz der jeweiligen Therapie steigern können, sind von besonderem Interesse. In den **Abschnitten 6.1. – 6.4.** wird deshalb auf die Verwendung von Zytokinen für die Tumorgentherapie fokussiert, da sie ein großes chemosensitivierendes Potential besitzen, das u.a. durch die Modulation von MDR-assoziierten Genen realisiert ist. Die hier enthaltenen Arbeiten beleuchten einerseits die molekularen Mechanismen dieser Zytokin-vermittelten Effekte in Tumorzellen, und demonstrieren andererseits ihre therapeutischen Wirkungen in gentherapeutischen Ansätzen.

In **Abschnitt 6.1.** (Stein et al. 1996) werden in vitro-Arbeiten zur MDR-modulierenden und chemosensitivierenden Wirkung der Zytokine IL-2, IFN- γ sowie TNF- α in HCT15- und HCT116-Kolonkarzinomzellen vorgestellt. Hierbei wurde der Einfluss extern applizierter, rekombinanter Zytokine speziell in Hinblick auf die Modulation der *mdr1*-Expression analysiert. Mit den Experimenten konnte gezeigt werden, dass IL-2, IFN- γ und TNF- α in der Lage sind, die *mdr1*-Expression zeitabhängig sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene zu reduzieren. Anschließende Zytostatika-Akkumulations-Assays bestätigten die funktionelle Bedeutung dieser *mdr1*-Expressionsmodulation, die sich in einer erhöhten intrazellulären Akkumulation des Zytostatikums Doxorubicin in beiden Tumorzelllinien widerspiegelte. In Zytotoxizitäts-Assays wurde darüber hinaus gezeigt, dass tatsächlich bei einer IL-2, IFN- γ bzw. TNF- α -Vorbehandlung die Zytokin-vermittelte Reduktion der *mdr1*-Expression zu einer dramatischen Chemosensitivierung der Kolonkarzinomzellen gegenüber den MDR-relevanten Zytostatika Vincristin und Doxorubicin führt. Diese Daten bieten somit eine molekulare Rationale für den kombinierten Einsatz von Zytokinen und der Chemotherapie mit MDR-relevanten Zytostatika.

Abschnitt 6.2. (Stein et al. 1996) beschreibt die Potenzen eines IL-2- oder TNF- α -Gentransfers in Hinblick auf die Modulation der *mdr1*-Genexpression und die Chemosensitivierung nach Gentransfer im Kolonkarzinomzellen. In stabil transfizierten, IL-2 oder TNF- α exprimierenden HCT15- und HCT116-Kolonkarzinomzellen konnte auf

mRNA- sowie auf Proteinebene die Reduktion der *mdr1*-Expression nachgewiesen werden. Diese Reduktion der Expression war dabei positiv mit der Expressionshöhe des jeweiligen Zytokins korreliert. Die funktionellen Analysen mit Doxorubicin ergaben, dass durch IL-2- und auch TNF- α -Gentransfer die intrazelluläre Akkumulation des Zytostatikums zunimmt. In vitro Zytotoxizitäts-Assays mit den Zytokin-exprimierenden Tumorzellen ergaben eine signifikante Steigerung der Sensitivität beider Zelllinien hinsichtlich der MDR-relevanten Zytostatika Vincristin und Doxorubicin. Diese Ergebnisse sind ein wesentlicher Beleg dafür, dass eine Tumorgentherapie mit Zytokingenen zu einer Reduktion der *mdr1*-Genexpression führt und damit im Rahmen einer Kombinationstherapie mit der Chemotherapie effizient eingesetzt werden kann.

In **Abschnitt 6.3.** (Stein et al. 1997) wird die Wirkung von extern appliziertem oder gentransfiziertem TNF- α auf die Expression der MDR-assozierten Gene Multidrug Resistance Associated Protein (MRP1) und LRP in Kolonkarzinomzellen untersucht. Die in vitro-Experimente belegen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die zeitabhängige Modulation der MRP1- und LRP-Expression durch externe Zytokinapplikation. Während die LRP-Expression in HCT15- und auch HCT116-Zellen reduziert wurde, war im Gegensatz dazu die Expression des MRP1-Gens in HCT15-Zellen erhöht, in HCT116-Zellen jedoch unverändert. Parallel zu diesen Experimenten wurde in stabil TNF- α -transfizierten HCT15- und HCT116-Zellen ebenfalls die Reduktion der LRP-Expression auf mRNA- und auf Proteinebene gezeigt, die positiv mit dem jeweiligen TNF- α -Expressionsniveau korrelierte. In Bezug auf MRP1 war jedoch durch den TNF- α -Gentransfer eine Erhöhung der Expression in beiden Zelllinien zu beobachten. Die Arbeit weist einerseits auf das komplexe Geschehen der Ausbildung einer Multidrug Resistenz hin, zeigt aber andererseits die Potenz der Zytokinbehandlung für die Modulation verschiedener MDR-assoziierter Gene mit dem Ziel der Chemosensitivierung.

In Ergänzung der Zytokin-vermittelten Wirkungen auf die Expression von MDR-assozierten Genen in Kolonkarzinomzellen, wurden derartige Untersuchungen auch an Glioblastomzellen durchgeführt. In **Abschnitt 6.4.** (Walther et al. 1995) wurde der Einfluss des TNF- α -Gentransfers in humanen U373MG Glioblastomzellen in vitro analysiert. Die TNF- α -Expression führte in diesen Zellen zu einer Reduktion der *mdr1*-Expression, die funktionell zu einer Erhöhung der intrazellulären Rhodamin-Akkumulation führte. Ähnlich, wie in den vorhergehenden Abschnitten an Kolonkarzinomzellen gezeigt, kann auch in transduzierten Glioblastomzellen durch die TNF- α -Expression eine Sensitivierung gegenüber den Zytostatika Vincristin und

Doxorubicin erreicht werden. Somit ist der TNF- α -Gentransfer in verschiedenen Tumormodellen in der Lage, durch Reversion der MDR die Effektivität der Chemotherapie zu erhöhen, und weist auf die breiten therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten dieser Strategie in der Tumorgentherapie hin.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND WERTUNG

Die Jet-Injection Technologie für den nicht-viralen in vivo Gentransfer in Tumoren

In den **Abschnitten 3.1. – 3.4.** wurde die Etablierung der Jet-Injection-Technologie beschrieben, die eine wesentliche Voraussetzung für die lokale nicht-virale Tumorgentherapie darstellt. Vergleichende Analysen verschiedener Jet-Injection-Systeme ermöglichten dabei die gezielte Auswahl und weitere Anwendung des Low-Volume Jet-Injectors. Im Rahmen der Evaluation der Effizienz des Gentransfers mit Hilfe der Jet-Injection wurden die Reportergen-Systeme LacZ und GFP im Lewis-Lung-Karzinom, B16-Melanom der Maus sowie in xenotransplantierten humanen Mammakarzinom-Modell und Kolonkarzinom-Modell in der Nude-Maus getestet. Es wurde gezeigt, dass der Jet-Injector-Prototyp in allen Tumormodellen zur effizienten Expression der Reportergene führt und dass sowohl Eindringtiefen, als auch Verteilung der Jet-Injection optimal für einen effizienten Gentransfer sind. Diese Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass mit Hilfe der Jet-Injection simultan zwei Genkonstrukte effektiv transfiziert und zur Expression gebracht werden können. Dies ermöglicht den einfachen, kombinierten Einsatz verschiedener therapeutischer Gene zur Behandlung von Tumoren. Die in vivo-Untersuchungen ergaben weiterhin, dass die Jet-Injection für den Transfer des TNF- α -Gens erfolgreich eingesetzt werden kann, wobei die Verteilung und die Höhe der Genexpression mit etablierten Gentransfer-Technologien, wie z.B. der in vivo-Lipofektion, vergleichbar ist. Ergänzende Untersuchungen konnten die molekularbiologischen sowie technologischen Rahmenbedingungen für einen reproduzierbaren in vivo-Gentransfer definieren. Aus allen Untersuchungen kann geschlussfolgert werden, dass die Jet-Injection eine sichere und auch effiziente Technologie für den intratumoralen und lokalen Gentransfer unter Verwendung nackter DNA darstellt, die das Potential für eine klinische Anwendung besitzt.

Untersuchungen zum retroviralen und liposomalen Gentransfer von Tumorzellen

Obwohl das vorrangige Ziel der bisher vorgestellten Arbeiten die nicht-virale Tumorgentherapie ist, wurden auch Untersuchungen mit retroviralen und liposomalen Transfersystemen durchgeführt. Dabei fokussierte sich **Abschnitt 4.1.** auf den liposomalen in vitro- und in vivo-Gentransfer, der auf einem neuartigen Lipoplex basiert. **Abschnitt 4.2.** jedoch beschäftigt sich vor allem auf den retroviralen Gentransfer des

TNF- α -Gens und dessen Einfluss auf intrazelluläre Expressionen spezifischer Gene. Beide Arbeiten können diese komplexen Gebiete der Gentherapie nur streifen, geben aber interessante Auskunft über die Effizienz, Wirkung und die Potenzen dieser Strategien. Bei beiden Systemen besteht der im Vergleich zur Jet-Injection-Technologie wesentlich höhere Aufwand der DNA-Formulierung für den Gentransfer, dem jedoch effiziente Transferraten gegenüberstehen. In diesem Kontext sollen die Abschnitte 4.1. und 4.2. als Ergänzung zu den vorhergehenden Arbeiten dienen, die die sehr unterschiedlichen Bemühungen auf dem Gebiet der Tumorgentherapie widerspiegeln.

Charakterisierung und Nutzung Therapie-induzierbarer Promotoren für eine konditionelle Tumorgentherapie

Die **Abschnitte 5.1. – 5.6.** wurden die Arbeiten zur Generierung eines Therapie-induzierbaren Vektorsystems dargestellt, in denen vor allem die Induktionseigenschaften des humanen *mdr1* Promotors erstmals gezielt genutzt wurden. Es konnte die Zytostatika- und auch Hitze-Induzierbarkeit der *mdr1*-Promotor gesteuerten Genexpression in verschiedenen Tumormodellen *in vitro* und *in vivo* erfolgreich demonstriert werden, wobei vor allem die Nutzung einer Mutationsvariante des *mdr1*-Promotors als besonders effiziente Regulationseinheit eingesetzt wurde. Die Zytostatika- und Hitze-Induktion des *mdr1*-Promotors erwies sich als reproduzierbar zeit- sowie konzentrationsabhängig, so dass die Expression des jeweiligen Fremdgens auf die spezifischen therapeutischen Bedingungen z.B. der Chemotherapie oder Hyperthermie eingestellt werden kann. Die niedrige Basalaktivität und signifikant hohe Induktion des *mdr1*-Promotors sowohl *in vitro* als vor allem *in vivo* weisen das System als einen effizienten konditionellen Regulator aus. Wesentlich für die gentherapeutische Nutzung des *mdr1*-Promotors sind die Befunde der Induzierbarkeit durch Zytostatika, wie Doxorubicin, Vincristin oder Taxol, die in der Chemotherapie von Tumorerkrankungen breiten Einsatz finden. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für das Konzept der kombinierten Applikation von Chemotherapie und konditioneller Tumorgentherapie. Die tierexperimentellen Untersuchungen konnten bestätigen, dass vor allem eine Zytostatika-induzierte Gentherapie im Kontext der Chemotherapie zu einer besseren Tumorthherapie beiträgt. Die Kombinations-Experimente im Kontext einer Hyperthermie geben erste Hinweise, dass auch hier die therapeutische Effektivität gesteigert werden kann.

Die Charakterisierung des MVP/LRP-Promotors bietet erste Anhaltspunkte, dass dieses System ebenfalls für die Konstruktion konditioneller Vektoren nutzbar ist und somit die Palette derartiger Regulationseinheiten wertvoll erweitern kann.

Chemosensitivierung als Strategie für die Gentherapie von Tumoren

Im Rahmen des Konzepts der kombinierten Gen- und Chemotherapie von Tumoren ist in den Arbeiten der **Abschnitte 6.1. – 6.4.** vor allem auf das chemosensitivierende Potential von Zytokinen gesetzt worden. Besonders für TNF- α , IL-2 sowie IFN- γ konnten experimentelle Daten dafür geliefert werden, dass diese Zytokine zu einer Modulation MDR-assoziiierter Gene, wie dem *mdr1*, MVP/LRP und auch MRP1 in der Lage sind. In Bezug auf die Gene *mdr1* und MVP/LRP ist die signifikante Reduktion der Expression auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen worden, die nicht nur zur intrazellulären Akkumulation MDR-assoziiierter Zytostatika, sondern auch zur Chemosensitivierung in verschiedenen Tumormodellen führt. Diese Befunde bilden eine wichtige Rationale für den Einsatz von Zytokingenen, die im Rahmen der Tumorgentherapie zur Überwindung der MDR eingesetzt werden können. Gentransferexperimente mit TNF- α - und IL-2-exprimierenden Vektoren konnten analog zur Applikation rekombinanter Zytokine die Modulation der Gene *mdr1* und MVP/LRP zeigen, die mit der Erhöhung der Sensitivität gegenüber Zytostatika wie Vincristin oder Adriamycin assoziiert ist. Wesentliche Zusammenhänge zwischen dem Niveau der Zytokingen-Expression und dem Ausmaß der Modulation von *mdr1* und MVP/LRP konnten klar definiert werden. Die experimentellen Arbeiten zeigen die Möglichkeit auf, mit Hilfe des Transfers von Zytokingenen deren Potential der MDR-Modulation für definierte Tumorentitäten im Rahmen einer Tumorgentherapie zu nutzen.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Peter M. Schlag, der durch seine langjährige Unterstützung, sein kontinuierliches Interesse sowie durch fachliche Diskussionen und konstruktive Kritik wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beitrug.

An dieser Stelle möchte ich all jenen Kollegen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mich auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat unterstützten und damit direkten oder indirekten Anteil an der Fertigstellung dieser Habilitationsarbeit haben.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin bedanken, ohne deren Unterstützung und gute Zusammenarbeit diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Detlev Ganten, PD Dr. Iduna Fichtner, und Dr. Ulrike Stein. Für experimentelle Anregungen und hilfreiche Diskussionen danke ich den Post-Doktoranden, Doktoranden und Diplomanden unseres Labors, insbesondere Holger Schwabe, Christian Lange, und Jana Wendt. Für die große Einsatzbereitschaft, Geduld und exzellente technische Mitarbeit an den Projekten danke ich ganz besonders Frau Lieselotte Malcherek und Frau Margit Lemm.

Den Kollegen des Instituts für Biochemie der Charité, besonders Dr. Ulrike Kuckelkorn, Prof. Dr. Siegfried Prehn, Prof. Cornelius Frömmel und Prof. Dr. Peter M. Kloetzel, gilt mein Dank für deren freundliche Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kooperationspartnern im Ausland, die über viele Jahre als Gastgeber bei Forschungsaufenthalten und als Kooperationspartner mit Anregungen und Diskussionen meine wissenschaftliche Arbeit unterstützt haben. Besonders möchte ich Dr. Robert H. Shoemaker, National Cancer Institute, Frederick, MD, für seine langjährige intensive Unterstützung danken, ohne die wesentliche Teile der vorliegenden Arbeiten nicht hätten entstehen können. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Priscilla A. Furth, Georgetown University, Washington, DC, für deren fachliche Anregungen, kritischen Gespräche sowie die gute Kooperation.

Meinen Kooperationspartnern der EMS Medical GmbH, besonders Herrn Dr. Andreas Menne, Thomas Nellessen, Wolfgang Merkle sowie Manfred Schulz gilt mein Dank für ihre konstruktiven Diskussionen und hilfreiche langjährige Unterstützung.

Für die Bereitstellung der finanziellen Unterstützung zur Realisierung der experimentellen Arbeiten im In- und Ausland danke ich der Alexander von Humboldt-Stiftung, Bonn, der Fogarty International Foundation, Bethesda, MD, der Science Applications International Corporation, Frederick, MD, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, der H.W. & J. Hector Stiftung, dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, der Berliner Krebsgesellschaft sowie den Kooperationspartnern in der Industrie.

Schließlich möchte ich meiner Frau Ulrike und meinem Sohn Philipp Maximilian für deren nicht ermüdendes Verständnis und die Unterstützung in jeder Hinsicht und auf jeder Ebene des privaten sowie wissenschaftlichen Alltags meinen ganz besonderen Dank ausdrücken. An dieser Stelle gilt meinen Eltern mein herzlicher Dank, die mir meine schulische und universitäre Ausbildung ermöglichten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- der Bewerberin oder dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift